



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT (Artikel 36 und Regel 70 PCT)

18 FEB 2005

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/44120-PCT	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09218	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20.08.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 20.08.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12P23/00		
Anmelder SUNGENE GMBH & CO. KGAA et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Bescheids</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priorität</p> <p>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		
Datum der Einreichung des Antrags  04.03.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  13.01.2005	
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde   Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Hornig, H  Tel. +31 70 340-2620  	

**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

**Beschreibung, Seiten**

1-23 in der ursprünglich eingereichten Fassung

**Ansprüche, Nr.**

1-22 eingegangen am 13.12.2004 mit Schreiben vom 13.12.2004

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☒ Ansprüche, Nr.: 23
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| 1. Feststellung                |   |
| Neuheit (N)                    | Ja: Ansprüche 1-22<br>Nein: Ansprüche   |
| Erfinderische Tätigkeit (IS)   | Ja: Ansprüche 1-22<br>Nein: Ansprüche   |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-22<br>Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen:

**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt I**

**Grundlage des Bescheides**

Die geänderten Ansprüche 1-22, eingereicht mit dem Brief vom 13.12. 2004 und erhalten am 13.12.2004, sind gemäss Artikel 34 (2)(b) PCT gewährbar. Die Grundlage des Bescheides basiert somit auf den geänderten Ansprüchen gemäss Regel 70.2 PCT.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

Es wird auf folgendes Dokumente verwiesen:

D5: P.B. JACOBS ET AL.: "The cleavage of Carotenoid esters by cholesterol Esterase" COMP. BIOCHEM. PHYSIOL., Bd. 72B, 1982, Seiten 157-160, XP008029124 PERGAMON PRESS LTD.

D6: T. AAKERMANN ET AL.: "Enzymatic Hydrolysis of Esters of Alkali labile Carotenols" BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION, Bd. 13, 1996, Seiten 157-163, XP008029126 OPA (OVERSEAS PUBLISHERS ASSOCIATION) AMSTERDAM B.V. PUBLISHED IN THE NETHERLANDS BY HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS GMBH

**1. Klarheit (Art. 6 PCT)**

1.1 Betreffs der Einwände, die hinsichtlich der Klarheit gemacht werden, erfordert Artikel 6 PCT unter anderem, dass die Ansprüche, die den Gegenstand für welchen ein Schutz beansprucht wird klar sind. Dies bedeutet, dass vom technischen Gesichtspunkt aus nicht

nur ein Anspruch verständlich sein muss, sondern, dass er den Gegenstand der Erfindung eindeutig definiert, was bedeutet, dass alle **essentiellen Eigenschaften**, die notwendig sind um den gewünschten Effekt zu erreichen oder anders ausgedrückt, die notwendig sind um das technische Problem in der es in der Anmeldung geht zu lösen.

1.2 Der Ausdruck " ... **gegebenenfalls**..." in Anspruch 1 und 5 ist ein fakultatives Merkmal. Ausdrücke dieser Art bewirken keine Beschränkung des Schutzzumfanges des Patentanspruchs, d.h. das nach einem derartigen Ausdruck stehende Merkmal ist ganz und gar fakultativ zu betrachten (siehe Richtlinien C-II, 4.6 zusammen mit Art. 6 PCT).

1.3 Dem abhängigen Anspruch 10 mangelt es Klarheit. Der Begriff: "...in einem **im Wesentlichen** nichtwässrigen Reaktionsmedium..", ist vage und unklar und erfüllt die Erfordernisse des Artikels 6 PCT insofern nicht, als der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. Ein wässrig-organisches Reaktionsmedium, besitzt laut Anmelder 5-95Vol.% eines organischen Lösungsmittels. Somit sollte ein nicht-wässriges Reaktionsmedium mehr als 95Vol.% organisches Lösungsmittel enthalten. Ein Reaktionsmedium mit weniger als 5Vol.% organischem Lösungsmittel, ist vermutlich ein wässriges Reaktionsmedium. Trotzdem, unklar ist und bleibt der Ausdruck "**im Wesentlichen** nichtwässrig ". Der Anmelder sollte den obige Ausdruck spezifizieren um dem Artikel 6 PCT zu genügen.

1.1.3 Der Ausdruck "...**wenigstens etwa**..." in Anspruch 1 ist vage und unklar und erfüllt die Erfordernisse des Artikels 6 PCT insofern nicht, als der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist.

## 2. Neuheit (Art. 33(2) PCT)

2.1 Die geänderten Ansprüche erscheinen neu zu sein und entsprechen somit den Erfordernissen des Art. 33(2) PCT.

## 3. Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

3.1 Nach Betrachtung der nun geänderten Ansprüche, ist **D6** nächstliegender Stand der

Technik. **D6** beschreibt die enantioselektive Hydrolyse eines Ketocarotinoidesters, (3R,S,3'R,S)-Astaxanthindipalmitat, unter Verwendung einer Lipase aus *Candida antarctica*. Die Ausbeute dabei betrug 5% neben unreaktiertem 89% Edukt. **D6** unterscheidet sich von dem Gegenstand der Anmeldung dadurch, dass die Hydrolyse des eingesetzten Ketocarotinoids nicht mit einer wenigstens 85%igen Ausbeute erfolgt. Mehrnoch **D6** räumt ein, dass das von von ihnen erzielte Resultat geringer ist als die in **D5** beschriebene Ausbeute.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden ein verbessertes Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Ketocarotenoid-estern mittels Lipasen bereitzustellen. Als Lösung bietet der Anmelder ein Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Ketocarotinoideestern, wobei man einen Ketocarotinoidesterhaltigen Reaktanden, abgeleitet von einem natürlichen oder genetisch veränderten Organismus mit einem esterspaltenden Enzym, ausgewählt unter Lipasen (EC 3.1.1.3), bis zur einer wenigstens etwa 85%igen hydrolytischen Esterspaltung inkubiert und das (die) gebildete(n) Ketocarotinoid(e) gegebenenfalls aus dem Reaktionsansatz isoliert.

**D5** beschreibt die enzymatische Hydrolyse von Ketocarotinoideestern (Astaxanthin-Diester) aus *Procambarus acutus* (Flusskrebs) in den Monoester und in freies Astaxanthin mittels eine Cholesterol-Esterase (EC 3.1.1.8) aus *Pseudomonas fluorescens*. Dabei ist das Ausmass der enzymatischen Hydrolyse abhängig von dem eingesetzten Ketocarotinoid. Die Hydrolyse von Astaxanthin-diester in den entsprechenden Monoester bzw. freies Astaxanthin variierte dabei gemäss Fig. 1 von 31% bis 13%. **D5** lehrt, dass durch Erhöhung der Enzymkonzentration sich die Ausbeute sogar bis auf 85% verbessern liesse. **D5** unterscheidet sich von dem Gegenstand der Anmeldung dadurch, dass es keine Lipase (EC 3.1.1.3) enthält.

Für einen Fachmann ist es nicht offensichtlich, die Gegenstände der beiden den Stand der Technik wiedergebenden Dokumente **D5** und **D6** miteinander zu kombinieren um zum selben Ergebnis wie in der vorliegenden Anmeldung zu gelangen.

3.1.1 In hinsicht auf **D6** und **D5** beruht der Gegenstand der Ansprüche 1-22 auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne von Artikel 33(3) PCT.

Geänderte Patentansprüche (14.12.2004)

1. Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Ketocarotinoidestern, wobei man einen Ketocarotinoidester-haltigen Reaktanden, abgeleitet von einem natürlichen oder genetisch veränderten Organismus mit einem esterspaltenden Enzym, ausgewählt unter Lipasen (E.C. 3.1.1.3), bis zu einer wenigstens etwa 85%igen hydrolytischen Esterspaltung inkubiert und das (die) gebildete(n) Ketocarotinoid(e) gegebenenfalls aus dem Reaktionsansatz isoliert.
2. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktionszeit im Bereich von 1 bis 48 Stunden liegt.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei dem Reaktionsansatz Enzym in einer Gesamtmenge zugesetzt wird, so dass die Gesamtkonzentration an zugesetzter Lipase bezogen auf den Gesamtcarotinoid-Gehalt im Bereich von 50 bis 3.000 U/ $\mu$ g liegt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man einen Ketocarotinoidester-haltigen Reaktanden in einem wasserhaltigen Reaktionsmedium mit dem esterspaltenden Enzym inkubiert, wobei die Ketocarotinoidester gegebenenfalls in emulgierter Form im Medium vorliegen und wobei dem Reaktionsmedium gegebenenfalls wenigstens ein Emulgator in einer Menge zugesetzt wird, so dass das Mengenverhältnis von Emulgator zu Gesamtcarotinoid im Bereich von 500:1 bis 1000:1 liegt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Emulgator wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter Cholsäure und Derivaten davon sowie Gemischen dieser Verbindungen umfasst.
6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der Emulgator eine Mischung von Cholsäure und Desoxycholsäure ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Reaktionsansatz einen pH-Wert im Bereich von etwa 6 bis 8 aufweist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Reaktionsmedium ein wässrig-organisches Medium ist, welches ein organisches Lösungsmittel in einem Volumenanteil von etwa 5 bis 95 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes, enthält.

20030067 MEC/58 20.08.03

M/44120-PCT

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das organischen Lösungsmittel ausgewählt ist unter Aceton, C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>-Alkanen, C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>-Alkanolen, Di-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylethern und aromatischen Lösungsmitteln und Gemischen davon.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, wobei man den Ketocarotinoidester-haltigen Reaktanden in einem im Wesentlichen nichtwässrigen Reaktionsmedium mit dem esterspaltenden Enzym inkubiert.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das nichtwässrige Reaktionsmedium wenigstens ein organisches Lösungsmittel, ausgewählt unter C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>-Alkanen, C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>-Alkanolen, Di-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylethern und aromatischen Lösungsmittel enthält.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Enzym eine Lipase aus *Candida* sp. ist.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Reaktand wenigstens einen Ketocarotinoid-Monoester oder -Diester einer C<sub>10-24</sub>-, vorzugsweise C<sub>12-20</sub>-Monocarbonsäure umfasst.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Reaktand abgeleitet ist aus natürlichen oder rekombinanten, pro- oder eukaryotischen Mikroorganismen oder Pflanzen oder Teilen davon.
15. Verfahren nach Anspruch 14 wobei der Reaktand durch Extraktion mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels oder Gemischen von organischen Lösungsmitteln gewonnen wird.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktion mehrstufig unter wiederholter Zugabe von Enzym erfolgt.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Enzym in trägergebundener Form eingesetzt wird.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktionstemperatur im Bereich von etwa 20 bis 70 °C liegt.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Ketocarotinoidester-haltige Reaktand wenigstens einen Ketocarotinoidester oder Gemische von Carotinoidestern und Ketocarotinoidestern umfasst.

M/44120-PCT



20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man die gespaltenen Ketocarotinoide aus dem Reaktionsmedium isoliert.

5 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Ketocarotinoidester abgeleitet ist von Astaxanthin.

10 22. Verwendung der nach einem der vorhergehenden Ansprüche hergestellten Ketocarotinoide zur Herstellung von Nahrungs- und Futtermittelzusätzen.

15

M/44120-PCT



Translation

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference M/44120-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP2003/009218	International filing date (day/month/year) 20 August 2003 (20.08.2003)	Priority date (day/month/year) 20 August 2002 (20.08.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 23/00		
Applicant SUNGENE GMBH & CO. KGAA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 March 2004 (04.03.2004)	Date of completion of this report 13 January 2005 (13.01.2005)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP2003/009218

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages \_\_\_\_\_ 1-23 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_ 1-22 \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ 13 December 2004 (13.12.2004)
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ 23 \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 03/09218

## 1. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The amended claims 1-22, submitted with the letter of 13 December 2004 and received on 13 December 2004, are admissible pursuant to PCT Article 34(2)(b). The report is therefore based on the amended claims pursuant to PCT Rule 70.2.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 03/09218

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D5: P.B. JACOBS ET AL.: "The cleavage of Carotenoid esters by cholesterol Esterase" COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. Vol. 72B, 1982, pages 157-160, XP008029124 PERGAMON PRESS LTD

D6: T. AAKERMANN ET AL.: "Enzymatic Hydrolysis of Esters of Alkali labile Carotenols" BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION, Vol. 13, 1996, pages 157-163, XP008029126 OPA (OVERSEAS PUBLISHERS ASSOCIATION) AMSTERDAM B.V. PUBLISHED IN THE NETHERLANDS BY HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS GMBH

1. Clarity (PCT Article 6)

1.1 Concerning the objections made with respect to clarity, PCT Article 6 requires, *inter alia*, that the claims which define a subject matter for which protection is sought be clear. This means that a claim not only has to be comprehensible from a technical point of view, but that it must define the subject matter of the invention unambiguously, which means that it must contain all

essential properties which are necessary to achieve the desired effect or, in other words, which are necessary to solve the technical problem addressed by the application.

1.2 The expression "optionally" in claims 1 and 5 is an optional feature. Expressions of this kind do not bring about any restriction in the scope of protection of a claim, that is, the feature which follows such an expression must be considered entirely optional (see Guidelines II-4.6 together with PCT Article 6).

1.3 Dependent claim 10 lacks clarity. The phrase "in a substantially non-aqueous reaction medium" is vague and unclear and does not meet the requirements of PCT Article 6 since the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. According to the applicant, an aqueous-organic reaction medium contains 5-95 vol.% organic solvent. Thus, a non-aqueous reaction medium ought to contain more than 95 vol.% organic solvent, and a reaction medium with less than 5 vol.% organic solvent would presumably be an aqueous reaction medium. Be all that as it may, the expression "substantially non-aqueous" is and remains unclear. The applicant should specify the above expression so as to satisfy PCT Article 6.

1.1.3 The expression "at least approximately" in claim 1 is vague and unclear and does not meet the requirements of PCT Article 6, since the subject matter for which protection is sought is not clearly defined.

## 2. Novelty (PCT Article 33(2))

2.1 The amended claims appear to be novel and thus to meet the requirements of PCT Article 33(2).

### 3. Inventive step (PCT Article 33(3))

3.1 In the light of the amended claims, D6 is the closest prior art. D6 describes the enantioselective hydrolysis of a ketocarotinoid ester, (3R,S,3'R,S)-astaxanthin dipalmitate, using a lipase from *Candida antartica*. The yield was 5% along with an unreacted 89% educt. D6 differs from the subject matter of the application in that the hydrolysis of the ketocarotinoid used does not lead to an at least 85% yield. Furthermore, D6 acknowledges that the result achieved is less than the yield described in D5.

The problem addressed by the present invention can therefore be considered that of providing an improved method for the enzymatic hydrolysis of ketocarotinoid esters using lipases. To solve the problem, the applicant proposes a method for the enzymatic hydrolysis of ketocarotinoid esters in which a ketocarotinoid ester-containing reactant, derived from a natural or genetically modified organism with an ester-splitting enzyme, selected from lipases (EC 3.1.1.3), is incubated until at least approximately 85% hydrolytic ester splitting has taken place, and the ketocarotinoid(s) formed thereby is/are optionally isolated from the reaction.

D5 describes the enzymatic hydrolysis of ketocarotinoid esters (astaxanthin diesters) from *Procambarus acutus* (white river crayfish) in the monoester and in free astaxanthin using a cholesterol esterase (EC 3.1.1.8) from *Pseudomonas fluorescens*. The extent of enzymatic hydrolysis in this method depends on the ketocarotinoid used. The hydrolysis of astaxanthin diesters in the corresponding monoester or free astaxanthin varied as per figure 1 from 31% to 13%. D5 teaches that by increasing

the enzyme concentration, the yield could be improved to as much as 85%. D5 differs from the subject matter of the application in that it does not contain any lipase (EC 3.1.1.3).

It is not obvious to a person skilled in the art to combine the subjects of the two prior art documents D5 and D6 so as to arrive at the same result as in the present application.

3.1.1 With respect to D6 and D5, the subject matter of claims 1-22 involves an inventive step (PCT Article 33(3)).